

PCT

THE BRITISH LIBRARY
SCIENCE REFERENCE AND INFORMATION SERVICE

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 9/10, 15/10	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/01540 (43) Date de publication internationale: 15 janvier 1998 (15.01.98)
---	----	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01116

(22) Date de dépôt international: 24 juin 1997 (24.06.97)

(30) Données relatives à la priorité:
96/08327 4 juillet 1996 (04.07.96) FR

(71) Déposant (*pour tous les Etats désignés sauf US*): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*US seulement*): CROUZET, Joël [FR/FR]; 12, rue Michel Voisin, F-92330 Sceaux (FR). CAMERON, Béatrice [FR/FR]; 6, rue Tournefort, F-75005 Paris (FR).

(74) Mandataire: SAVINA, Jacques; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).

(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING THERAPEUTIC DNA

(54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION D'ADN THERAPEUTIQUE

(57) Abstract

The invention discloses the preparation of DNA, in particular plasmid DNA. More particularly it concerns the production of bacterial plasmid DNA to be used in gene therapy, in the form of plasmid, minicircle supercoiled, loose or linear.

(57) Abrégé

La présente invention concerne la préparation d'ADN, notamment plasmidique. Elle concerne plus particulièrement la production d'ADN plasmidique bactérien qui soit utilisable en thérapie génique, sous la forme de plasmide, de minicercle surenroulé, relâché ou linéaire.

PROCEDE DE PRODUCTION D'ADN THERAPEUTIQUE

La présente invention concerne la préparation d'ADN, notamment plasmidique. Elle concerne plus particulièrement la production d'ADN plasmidique bactérien qui soit utilisable en thérapie génique, sous la forme de plasmide, de minicercle surenroulé, relâché ou linéaire, et dont les propriétés immunogènes sont réduites voire supprimées. L'invention concerne également des microorganismes utilisables pour la production d'ADN, ainsi que des compositions pharmaceutiques.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie en introduisant une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information peut être introduite soit in vitro dans une cellule extraite de l'organe et ensuite réinjectée dans l'organisme, soit in vivo, directement dans le tissu visé. S'agissant d'une molécule de haut poids moléculaire et de charge négative, l'ADN a des difficultés pour traverser spontanément les membranes cellulaires phospholipidiques. Différents vecteurs sont donc utilisés afin de permettre le transfert de gène : les vecteurs viraux d'une part, les vecteurs chimiques et/ou biochimiques, naturels ou synthétiques, d'autre part. Les vecteurs viraux (rétrovirus, adénovirus, virus adéno-associés,...) sont très efficaces, notamment pour le passage des membranes, mais présentent un certain nombre de risques tels que la pathogénicité, la recombinaison, la réplication, l'immunogénicité, ... Les vecteurs chimiques et/ou biochimiques permettent d'éviter ces risques (pour revues, voir Behr, 1993, Cotten et Wagner, 1993). Ce sont par exemple des cations (phosphate de calcium, DEAE-dextran,...) qui agissent en formant des précipités avec l'ADN, lesquels peuvent être "phagocytés" par les cellules. Il peut également s'agir de liposomes dans lesquels l'ADN est incorporé et qui fusionnent avec la membrane plasmique. Les vecteurs synthétiques de transfert de gènes sont généralement des lipides ou des polymères cationiques qui complexent l'ADN et forment avec lui une particule portant des charges positives en surface. Ces particules sont capables d'interagir avec les charges négatives de la membrane cellulaire, puis de franchir celle-ci. On peut citer comme exemples de tels vecteurs le dioctadécylamidoglycylspermine (DOGS, TransfectamTM) ou le chlorure de N-[1-

Un autre inconvenient des ADN plasmidiques utilises jusqu'a present reside dans leur origine. Il s'agit en effet de molecules produites essentiellement dans des organismes procaryotes (bacteries) ou eucaryotes inferieurs (levures), qui possedent potentiellement des motifs immunogenes chez l'homme. Les propriétés immunologiques de l'ADN sont encore assez peu connues. L'ADN bacterien chez la souris conduit i) à la synthèse d'anticorps reconnaissant l'ADN bacterien double brin et simple brin ayant permis l'immunisation mais ne reagissant pas avec l'ADN double brin mammifere, ii) à la stimulation de la production de macrophages et cytokines (D. Pisetsky "the Immunologic Properties of DNA" J. Immunol. 156 (1996) 1). La macromolecule ADN est ainsi dite immunogene. Par ailleurs, une macromolecule peut aussi conduire à une stimulation du systeme immunitaire sans être immunogene (par exemple corps étranger conduisant à une réponse immunitaire à médiation cellulaire). Les premières evidences suggerant que l'ADN bacterien conduit à une réponse immunitaire ont été décrites par Pisetsky et coll. (1991 J. Immunol. 147 p1759). Ils ont montré que l'ADN de trois espèces bacteriennes peut stimuler la prolifération de lymphocytes de souris alors que l'ADN extrait de trois espèces animales ne conduit pas à cette stimulation. Puis, Yamamoto et coll. (1992 Microbiol. Immunol. 36 p983) ont observé que l'ADN bacterien de six espèces conduit dans les cellules de rate de souris BALB/c à une augmentation de l'activité NK "natural killer" et à l'induction de la production d'interférons. Mais l'ADN extrait de dix espèces vertébrées ne conduit à aucune de ces réponses. En outre, Krieg et coll. ont décrit en 1995 (Nature vol374 p546) qu'un fragment d'ADN genomique de E.coli induit *in vitro* la prolifération de cellules B murines et la sécrétion d'immunoglobulines IgM, alors que ce même ADN bacterien, traite *in vitro* avec une CpG méthylase, n'induit pas une telle réponse. Krieg et coll. ont aussi indiqué qu'en présence d'ADN non méthylé, l'interféron γ est produit, et agit comme facteur costimulant de la différenciation des cellules B en modulant la production d'IL-6 par les cellules B (Krieg et coll. 1996 J. Immunol. 156 p558). De plus un oligonucleotide possédant un motif CpG non méthylé et encadré en 5' par 2 purines et en 3' par 2 pyrimidines conduit *in vivo* à une sécrétion coordonnée des interleukines IL-6 et IL-12, et d'interférons γ par les cellules NK (IFN- γ), les cellules B (IL-6 et IL-12) et les

expression d'une méthylase. L'invention dans d'autres aspects, est relative à des cassettes d'expression, des microorganismes hôtes utilisables pour la méthylation, la préparation de compositions thérapeutiques, et des méthodes de transfert de gènes.

5 Un premier objet de l'invention concerne donc un procédé de production d'ADN utilisable en thérapie génique caractérisé en ce que ledit ADN est produit dans une cellule contenant une cassette d'expression d'une ADN méthyltransférase permettant de méthyliser les résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3'.

La présente invention concerne donc la production d'ADN, notamment plasmidique, méthylé sur les résidus cytosine des dinucléotides 5'-CG-3'.

10 La méthylation d'ADN plasmidique in vitro est documentée dans la littérature (Adams et coll. 1992 FEBS Letters 309 p97 ; Doerfler 1994 FEBS Letters 344 p251 ; Komura et coll. 1995 Biochim. Biophys. Acta 1260 p73). Cependant, ce mode de méthylation n'est pas envisageable pour la production industrielle de plasmide qui serait utilisé en thérapie génique. Un procédé de production d'ADN
15 plasmidique doit en effet permettre de produire de façon reproductible des quantités de plasmides importantes et homogènes et de purifier cet ADN par des méthodes acceptables pour un usage pharmaceutique. Il est bien clair qu'un ADN méthylé in vitro peut-être plus ou moins relâché de lot à lot (Doerfler 1994 FEBS Letters 344 p251) et que les quantités produites sont limitées.

20 La présente invention montre maintenant qu'il est possible de méthyliser un plasmide d'intérêt directement au cours de la production, en coexprimant dans la cellule hôte le gène codant pour une méthylase. La présente invention montre également que, selon ce procédé, des quantités importantes et homogènes de plasmide méthylé peuvent être produites et l'ADN plasmidique méthylé peut être
25 purifié selon des procédés déjà décrits. La demanderesse a également démontré, de manière avantageuse, que l'ADN plasmidique ainsi méthylé conserve la capacité de transfecter des cellules cibles et, le cas échéant, de s'y répliquer. De manière particulièrement remarquable, la demanderesse a encore démontré que l'ADN plasmidique ainsi méthylé peut, *in vivo*, exprimer des acides nucléiques d'intérêt.

l'absence dudit gène. Il s'agit préférentiellement de cellules procaryotes ou eucaryotes simples.

Avantageusement, l'hôte cellulaire est une bactérie. Parmi les bactéries, on peut citer plus préférentiellement E.coli, B. subtilis, Streptomyces, Pseudomonas (P. putida, P. aeruginosa), Rhizobium meliloti, Agrobacterium tumefaciens, Staphylococcus aureus, Streptomyces pristinaespiralis, Enterococcus faecium ou Clostridium. On peut aussi utiliser des entérobactéries telles que Salmonella typhimurium, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes, Erwinia carotovora ou Serratia marcescens. Préférentiellement, l'hôte cellulaire utilisé est un organisme non pathogène et permet de produire des quantités d'ADN plasmidique importantes et homogènes. A titre d'exemple particulièrement préféré, on utilise E. coli.

Le procédé de l'invention permet la production d'ADN de qualité thérapeutique.

L'ADN peut être toute molécule d'ADN, simple-brin ou double-brin, linéaire ou circulaire, replicative ou non, intégrative ou non, sous la forme de plasmide, de minicercle surenroulé, relâché ou linéaire. Dans la suite du texte, l'ADN sera également référencé ADN plasmidique ou plasmide TG (pour plasmide utilisable en thérapie génique).

Les plasmides TG généralement utilisés en thérapie génique portent essentiellement (i) une origine de répllication, (ii) un ou plusieurs acides nucléiques d'intérêt (gène thérapeutique) avec des séquences nécessaires à leur expression (enhanceur(s), promoteur(s), séquences de polyadénylation...), et éventuellement (iii) un gène marqueur.

Le choix de l'origine de répllication est principalement déterminé par l'hôte cellulaire utilisé pour la production.. Il peut s'agir d'une origine de répllication issue d'un plasmide du groupe d'incompatibilité P (exemple = pRK290) qui permet la répllication dans les souches d'E. coli pol A. Plus généralement, il peut s'agir de toute origine de répllication issue d'un plasmide se répliquant dans les cellules procaryotes

séquences nécessaires à leur expression. Selon un mode préféré, il s'agit d'une molécule circulaire, replicative ou integrative. Avantageusement, l'ADN plasmidique contient essentiellement un ou plusieurs acides nucléiques d'intérêt avec des séquences nécessaires à leur expression (miniplasmide).

- 5 L'acide nucléique d'intérêt peut être tout acide nucléique (ADNc, ADNg, ADN synthétique ou semi-synthétique, etc) dont la transcription et éventuellement la traduction dans une cellule génèrent des produits ayant un intérêt thérapeutique, vaccinal, agronomique ou vétérinaire.

- 10 Parmi les acides nucléiques ayant des propriétés thérapeutiques, on peut citer plus particulièrement les gènes codant pour des enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 05125), la
- 15 dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, etc, les gènes suicides : Thymidine kinase, cytosine désaminase, etc; ou encore tout ou partie d'une immunoglobuline naturelle ou artificielle (Fab, ScFv, etc), un ARN ligand
- 20 (WO91/19813) etc. Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique
- 25 décrite dans le brevet EP 140 308.

L'acide nucléique d'intérêt peut aussi être un gène vaccinant, c'est-à-dire un gène codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire, en vue de la réalisation de vaccins. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'epstein barr, du virus

Par ailleurs, le gène d'intérêt peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit synthétisé, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence
5 signal artificielle.

Selon l'acide nucleique d'intérêt, les ADN plasmidiques méthyles de l'invention peuvent être utilisés pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies, incluant les maladies génétiques (dystrophie, fibrose kystique, etc), les maladies neurodégénératives (alzheimer, parkinson, ALS, etc), les cancers, les
10 pathologies liées aux désordres de la coagulation ou aux dyslipoprotéïnémies, les pathologies liées aux infections virales (hépatites, SIDA, etc), ou dans les domaines agronomique et vétérinaire, etc. Ils sont particulièrement avantageux pour le traitement des pathologies dans lesquelles une expression durable sans réaction immunologique est souhaitée, notamment dans le domaine des maladies génétiques,
15 neurodégénératives et cardiovasculaires.

Comme indique ci-avant, le procédé selon l'invention utilise une cellule hôte contenant une cassette d'expression d'un ADN méthyltransférase permettant de méthyle les résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3'.

Après synthèse de l'ADN, certaines purines et pyrimidines sont modifiées chimiquement, par exemple par méthylation. Ainsi, la 5-méthylcytosine ou la N⁶-méthyladénine entrent dans la composition de certains ADN. Ces modifications ont lieu à l'aide d'ADN méthyltransférases, de maintien ou de novo, qui transfèrent un groupe méthyle de la S-adénosyl-L-méthionine à des résidus adénine ou cytosine qui peuvent être situés à des positions spécifiques dans les séquences. Par exemple, chez
20 E. coli deux ADN méthyltransférases sont bien connues, l'ADN méthyltransférase dam, qui méthyle les résidus adénosine au sein des séquences 5'-GATC-3', et l'ADN méthyltransférase dcm, qui méthyle le second résidu cytidine des séquences 5'-CCA/TGG-3'. D'autres ADN méthylases ont été étudiées chez les bactéries, qui méthylent un résidu contenu dans un site de reconnaissance d'une enzyme de
25

La méthylation de l'ADN plasmidique peut être vérifiée de différentes manières. En particulier, elle peut être contrôlée en digérant les préparations plasmidiques par des enzymes de restriction dont la coupure n'est pas possible si le résidu cytosine du dinucléotide 5'-CG-3', contenu dans le site de coupure, est méthylé. On peut citer par exemple les enzymes de restrictions HpaII, AatII, BstBI.
5 La methylation peut egalement etre determinee par chromatographie. Ainsi, la quantité de plasmide non méthylé présente dans la préparation de plasmide méthylé a été quantifiée de la façon suivante : au plasmide non méthylé non digéré sont ajoutés 1 % ou 5 % de plasmide non méthylé et totalement digéré par HpaII. Ces
10 échantillons, ainsi que le plasmide méthylé digéré par HpaII, sont analysés par chromatographie liquide échangeuse d'anions et détection à 260 nm, ce qui permet de séparer et quantifier l'ADN non digéré de l'ADN digéré. On constate que le plasmide méthylé contient moins de 5 % d'ADN plasmidique non méthylé, autrement dit que plus de 95% de l'ADN plasmidique est méthyle.

15 Avantageusement, le procédé de l'invention est caractérisé en ce que l'ADN méthyltransférase méthyle préférentiellement les résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3'.

Avantageusement, dans le procédé selon l'invention, plus de 50% des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles. Encore
20 plus préférentiellement, plus de 80 %, particulièrement plus de 90 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.

Plusieurs ADN méthyltransférases mammifères permettant de méthyler les résidus cytosine sur les séquences contenant tout dinucléotide 5'-CG-3' ont été caractérisées et les gènes correspondant ont été clonés, par exemple celle de la souris
25 (Bestor et coll. 1988 J. Mol. Biol. 203 p971) ou celle de l'homme (Yen et coll. 1992 Nucl. Acids Res. 20 p2287). Ces enzymes ont un poids moléculaire compris entre 135 et 175 kD. Elles méthylent l'ADN hémiméthylé beaucoup plus rapidement que le non méthylé, suggérant que ce sont des méthylases de maintien (Smith 1994 Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 49 p65). L'enzyme

La cassette d'expression de l'ADN méthyltransférase peut être portée par un vecteur replicatif, ou être intégrée dans le génome de la cellule hôte.

S'agissant d'un vecteur replicatif, on utilise avantageusement un vecteur compatible avec le plasmide TG, c'est à dire capable de co-resider dans la même cellule. Deux plasmides différents peuvent se répliquer dans la même cellule si le contrôle de la répllication de chaque plasmide est différent. Ainsi des plasmides compatibles appartiennent à deux groupes d'incompatibilité. Or il existe environ 30 groupes d'incompatibilité de plasmides se répliquant chez les entérobactéries (Maas et coll. 1988 Microbiol. Rev. 52 p375). De ce fait, il existe de nombreuses possibilités pour répliquer deux plasmides dans la même cellule et plusieurs exemples sont décrits dans la littérature. On peut citer par exemple la corépllication des plasmides dérivés de ColE1 avec les plasmides ayant pour réplicon R6K ou p15A ou RSF1010 ou RK2 ; on peut encore citer la corépllication des plasmides dérivés de RK2 avec des plasmides dérivés de R6K ou RSF1010 ou pSa ou ColE1 (in Vectors 1988 p287 Rodriguez et Denhardt éditeurs). Cette liste n'est pas limitative et d'autres exemples sont encore décrits dans Vectors 1988 p287 Rodriguez et Denhardt éditeurs. Avantageusement, le vecteur replicatif utilise présente un nombre de copies différent dans la cellule hôte que le plasmide TG. Ainsi, le vecteur portant le gène codant pour la méthylase, dont l'expression peut être inductible, est à faible nombre de copies (dérivé par exemple de pACYC184 ou RK2), alors que le plasmide TG est à haut nombre de copies (dérivé de ColE1). On peut aussi cloner dans le plasmide TG une séquence permettant de former avec un oligonucléotide approprié une séquence triple hélice de telle sorte que le plasmide TG peut être séparé de l'autre plasmide par une purification d'affinité.

La cassette d'expression de l'ADN méthyltransférase peut également être intégrée dans le génome de la cellule hôte. L'intégration peut être réalisée par recombinaison homologue, dans la mesure où la cassette d'expression est encadrée par des fragments adjacents d'un gène, non essentiel, du génome de l'hôte et clonée sur un plasmide ne pouvant se répliquer dans l'hôte considéré. Ce plasmide peut être

i) un dérivé de ColE1 dans une souche de *E. coli* polA^{ts} (Guttererson et coll. 1983

L'ADN plasmidique méthyle selon l'invention peut ensuite être purifié par toute technique connue de l'homme du métier (precipitations, chromatographies, centrifugations, dialyse, etc). Dans le cas particulier de l'utilisation d'un vecteur d'expression de la méthyltransferase replicatif, le plasmide TG doit en outre être
5 séparé dudit vecteur. Différentes techniques peuvent être utilisées, basées sur les différences de taille ou de masse des deux plasmides, ou sur la digestion du vecteur au niveau de sites de restriction présents uniquement dans le vecteur et pas dans le plasmide TG. Une méthode de purification particulièrement avantageuse repose sur la l'affinité entre une séquence spécifique présente sur le plasmide TG et un
10 oligonucleotide immobilisé. Cette purification triple-hélice a été décrite en détail dans les demandes FR96 03519 et FR94 15162, qui sont incorporées à la présente par référence.

Un résultat particulièrement avantageux de l'invention est que l'ADN plasmidique méthylé dans les conditions de l'invention conduit à l'expression du
15 gène sous le contrôle du promoteur aussi bonne que celle obtenue avec le même ADN plasmidique non méthylé. Cet ADN plasmidique méthylé ne devrait pas entraîner la stimulation immunitaire associée aux ADN bactériens et possède donc un avantage certain pour être utilisé en thérapie génique non virale.

Les ADN plasmidiques méthylés selon l'invention peuvent être utilisés dans
20 toute application de vaccination ou de thérapie génique et cellulaire, pour le transfert d'un gène à un organisme, un tissu ou une cellule donnée. En particulier, elles peuvent être utilisées pour une administration directe in vivo, ou pour la modification de cellules in vitro ou ex vivo, en vue de leur implantation à un patient. A cet égard, les molécules selon l'invention peuvent être utilisées telles quelles (sous
25 forme d'ADN nu), ou en association avec différents vecteurs chimiques et/ou biochimiques, synthétiques ou naturels. Il peut s'agir notamment de cations (phosphate de calcium, DEAE-dextran,...) qui agissent en formant des précipités avec l'ADN, lesquels peuvent être "phagocytés" par les cellules. Il peut également s'agir de liposomes dans lesquels la molécule d'ADN est incorporée et qui fusionnent
30 avec la membrane plasmique. Les vecteurs synthétiques de transfert de gènes sont

notamment en fonction du gène, du vecteur, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5 LEGENDE DES FIGURES

Figure 1. Carte du plasmide pXL2784

Figure 2. Carte de restriction du plasmide pXL2784

Figure 3. Profil de digestion des plasmides 1-pXL2784, 2-pXL2784 méthylé, 3-pXL2784+pAIT2 méthylés et 4-pAIT2 méthylé, digérés par les enzymes A-AatII, 10 B-BstBI, C-HindIII, D-HpaII, E-EcoRI (M est le marqueur de poids moléculaire 1KB ladder).

TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE ET DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les méthodes classiques de biologie moléculaire telles que la centrifugation 15 d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium-bromure d'éthidium, les digestions par des enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel, l'électroélution des fragments d'ADN à partir de gels d'agarose, la transformation dans *E. coli*, la précipitation des acides nucléiques etc, sont décrites dans la littérature (Maniatis *et al.*, 1989, Ausubel *et al.*, 1987). Les séquences nucléotidiques ont été déterminées 20 par la méthode de terminaison de chaînes en suivant le protocole déjà présenté (Ausubel *et al.*, 1987).

Les enzymes de restriction ont été fournies par New-England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham Ltd (Amersham).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille sur des 25 gels d'agarose à 0,7 % ou d'acrylamide à 8 %, purifiés par électrophorèse puis électroélution, extraits au phénol, précipités à l'éthanol puis incubés dans un tampon

Cette cassette d'expression a été clonée dans le plasmide réplcatif chez *E. coli* pXL2784 dont la carte est présentée sur la figure 1. Le plasmide a une taille de 6390 bp et comporte 5,8 % de dinucléotides 5'-CG-3'. Le plasmide pXL2784 a été construit à partir du vecteur pXL2675 (2,513 kb), réplicon minimal de ColE1 issu de pBluescript (ORI) et ayant pour marqueur de sélection le gène du transposon Tn5 codant pour la résistance à la kanamycine. Le plasmide pXL2784 contient aussi une séquence TH (GAA)₁₇ pouvant se lier à un oligomère (CTT)_n où n=1 à 17, pour générer localement une structure triple hélice et permettre une purification par affinité. Le plasmide pXL2784 possède le locus *cer* (382 bp) issu de ColE1 ; le locus *cer* contient une séquence site spécifique des recombinaisons XerC/XerD et conduit à la résolution de dimères de plasmides (Summers et coll. 1988 EMBO J. 7 p851). Le transgène cloné sur ce plasmide pXL2784 est une cassette d'expression (3,3 kb) du gène *luc* codant pour la luciférase de *Photinus pyralis* (provenant de pGL2 basic de Promega) sous contrôle du enhanceur/promoteur pCMV cytomégalovirus humain (provenant de pcDNA3 d'Invitrogen).

Exemple 2 : Construction d'une cassette d'expression d'une ADN méthyltransferase

Cet exemple décrit la structure d'une cassette d'expression de la méthylase M. *SssI* de *Spiroplasma* sp. MQ1. Il est entendu que le même principe peut être appliqué à la construction de cassette d'expression de toute autre enzyme selon l'invention.

La cassette d'expression utilisée comprend le gène codant la méthylase M. *SssI* de *Spiroplasma* sp. MQ1 qui est exprimé sous le contrôle du promoteur plac. Ainsi, en présence IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) la méthylase est synthétisée et active (Gotschlich et al. 1991 J. Bacteriol. 173 p5793).

Cette cassette est présente dans le plasmide pAIT2, qui a pour réplicon le pACYC184 et porte en outre le gène du transposon Tn903 codant pour la résistance à la lividomycine, permettant la sélection des cellules hôtes transformées.

exemple 4) aucune digestion n'a lieu avec les enzymes HpaII, AatII, BstBI alors que les digestions par les enzymes HindIII et EcoRI conduisent bien au profil attendu d'après la carte de restriction. Les digestions contrôles par les enzymes HpaII, AatII, BstBI du plasmide pXL2784 présentent le profil escompté d'après la carte de
5 restriction.

Ces resultats demontrent que l'ADN plasmidique extrait est méthylé, sur les résidus cytosine du dinucléotide 5'-CG-3'. Ces resultats montrent en outre que la methylation concerne plus de 90% de ces cytosines.

10 Exemple 4. Utilisation de plasmides methyles pour le transfert de matériel génétique

Cet exemple demontre que l'ADN plasmidique methyle selon l'invention conserve sa capacite de transfecter des cellules, de s'y repliquer, et d'y exprimer un gene d'interet.

A protocole de préparation des solutions utilisées pour la transfection

15 Deux lots de plasmides sont utilisés pour des étude comparatives :

- a) le pXL2784,
- b) le pXL2784 méthylé.

Le plasmide pXL2784 méthylé est obtenu sous forme d'un mélange avec le plasmide pAIT2 qui en a assuré la méthylation après co-transformation bactérienne.
20 Un fractionnement par chromatographie d'affinité a été réalisé pour purifier le plasmide d'intérêt et la technique utilisée est décrite dans la demande N° FR 94+15162. Une étape de dialyse contre du NaCl 0,15M peut être réalisée pour éliminer le tampon qui constitue la phase d'élution de la colonne.

Lorsque le plasmide pXL2784 est utilisé en référence il est purifié selon le
25 même protocole que celui décrit ci-dessus.

Cellule	Cellules NIH 3T3		Cellules Hela	
	pXL2784	pXL2784CH3	pXL2784	pXL2784CH3
Plasmide purifié par chromatographie d'affinité	$2,0.10^{10} \pm 4\%$	$2,2.10^{10} \pm 10\%$	$3,1.10^8 \pm 15\%$	$1,7.10^8 \pm 11\%$
et dialysé	$2,3.10^{10} \pm 21\%$	$3,1.10^{10} \pm 10\%$	$3,8.10^8 \pm 14\%$	$2,4.10^8 \pm 7\%$

Activité enzymatique en RLU/10 secondes/mg protéine (coefficient de variation % [3 expériences de transfection par résultat])

- Compte tenu des coefficients de variation obtenus pour ce type d'expériences nous pouvons conclure qu'il n'existe pas de différences significatives quant à l'expression des deux plasmides utilisés dans les mêmes conditions de transfection. De plus l'activité luciférase obtenue est du même ordre de grandeur pour les deux étapes de purification considérées.

10. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que plus de 50 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.

11. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que plus de 80 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.

5 12. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que plus de 90 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.

13. Utilisation d'un ADN plasmidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement thérapeutique ou diagnostic du corps humain ou animal, caractérisée en ce que plus de 50 % des résidus cytosine des dinucléotide
10 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.

14. Utilisation d'un ADN plasmidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement thérapeutique ou diagnostic du corps humain ou animal, caractérisée en ce que plus de 80 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.

15 15. Utilisation d'un ADN plasmidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement thérapeutique ou diagnostic du corps humain ou animal, caractérisée en ce que plus de 90 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.

16. Procédé de préparation d'une composition pharmaceutique destinée au
20 traitement thérapeutique ou diagnostic du corps humain ou animal comprenant les étapes suivantes :

- la production d'ADN par culture d'une cellule comprenant ledit ADN et une cassette d'expression d'une ADN méthyltransférase permettant de méthyler les résidus cytosine des dinucléotides 5'-CG-3',

25 - la récupération dudit ADN, et,

- le conditionnement dudit ADN avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

1/3

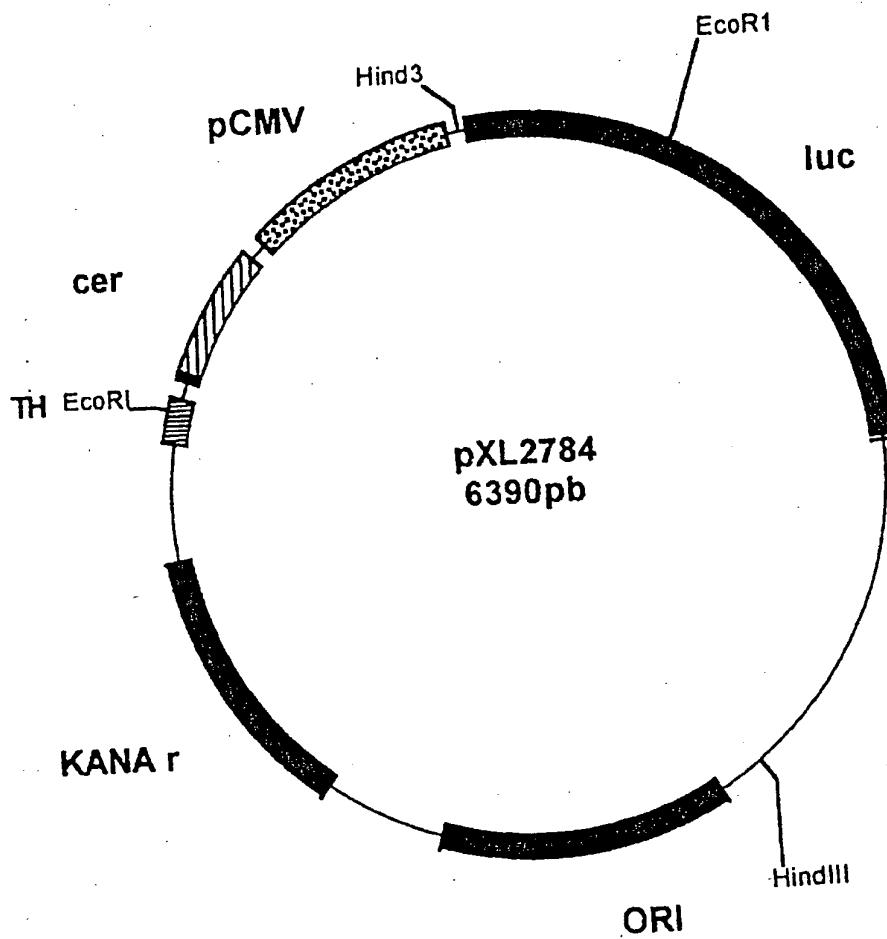


FIGURE 1

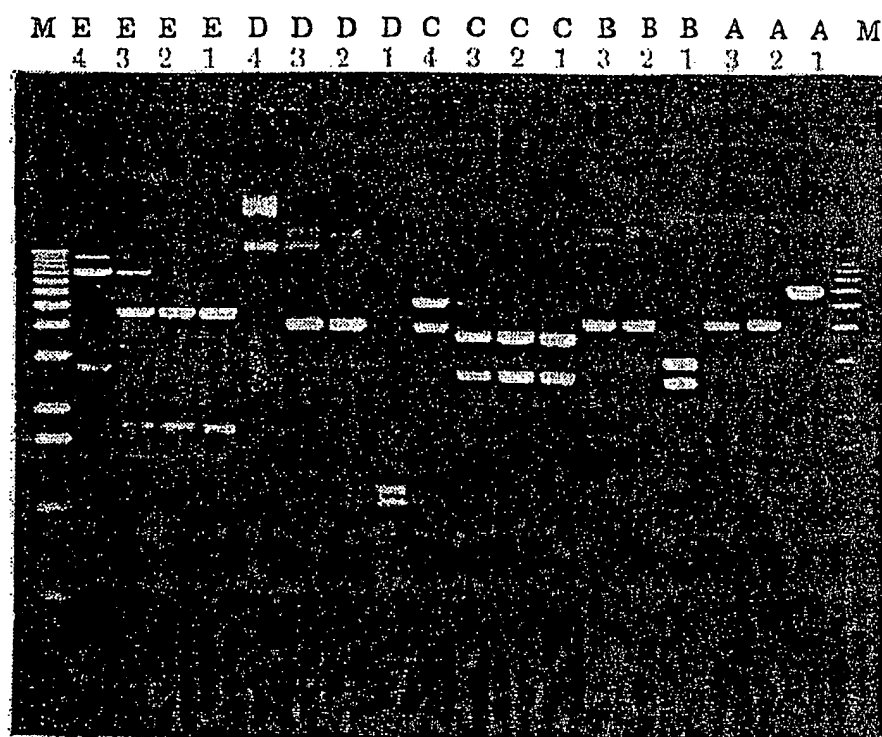


Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/01116

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim No.
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
A	<p>ANTISENSE RESEARCH AND DEVELOPMENT, vol. 5, no. 3, 1995, NEW YORK, US, pages 219-225, XP002027069 D.S. PISETSKY: "Immunological consequences of nucleic-acid therapy" see the whole document</p>	1-19
A	<p>EP 0 412 676 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSA) 13 February 1991 cited in the application see the whole document</p>	1-12
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 93, 1996, WASHINGTON, US, pages 2879-2883, XP000197059 D.M. KLINMAN ET AL.,: "CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma" cited in the application see the whole document</p>	1-12
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 147, no. 6, 1991, BETHESDA, US, pages 1759-1764, XP000645281 J.P. MESSINA ET AL.,: "Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA" cited in the application see the whole document</p>	1-12
A	<p>US 5 470 740 A (M.C. LONGO ET AL) 28 November 1995 see column 2, line 38-50</p>	1-12
A	<p>WO 95 16045 A (BIOTECHNOLOGY AND RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION) 15 June 1995 see page 6, line 11-30</p>	1-19
A	<p>ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 772, 1995, NEW YORK, US, pages 152-163, XP000197067 D.S. PISETSKY ET AL.: "Immunological properties of bacterial DNA" cited in the application see the whole document</p>	1-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 97/01116

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N9/10 C12N15/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	NATURE, vol. 374, no. 6522, 1995, LONDON, GB, pages 546-549, XP000197060 A.M. KRIEG ET AL.: "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation" cité dans la demande (voir dernier paragraphe) voir le document en entier	1-12
Y	WO 96 02555 A (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 1 Février 1996 voir page 8, ligne 7-16 voir page 19, ligne 22-35 voir page 23, ligne 4-13 voir revendications 22,23	1-12
A	---	13-15

	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 Septembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19.09.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell, A.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Deman. Internationale No
PCT/FR 97/01116

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9602555 A	01-02-96	AU 1912795 A EP 0772619 A	16-02-96 14-05-97
EP 0412676 A	13-02-91	DE 69019890 D DE 69019890 T JP 2538806 B JP 3210176 A US 5296371 A	13-07-95 08-02-96 02-10-96 13-09-91 22-03-94
US 5470740 A	28-11-95	AUCUN	
WO 9516045 A	15-06-95	US 5587305 A AU 1303195 A EP 0733114 A	24-12-96 27-06-95 25-09-96

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)